

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PRODUCTION OF WHEAT beta-AMYLASE AGENT

Patenttinumero: JP63248389
 Julkaisupaiva: 1988-10-14
 Keksija(t): MATSUMURA YOSHIICHI, others 05
 Hakija(t): UEDA KAGAKU KOGYO KK
 Pyydetty patentti: ☐ JP63248389
 Hakemusnumero: JP19870082725 19870402
 Prioriteettinumero(t):
 IPC-luokitus: C12N9/26
 EC-luokitus:
 Vastineet: JP1619642C, JP2036231B

Tiivistelmä

PURPOSE To produce a beta-amylase agent having high quality and titer, by forming calcium phosphate gel in a beta-amylase-containing waste liquid of wheat starch production process, adsorbing beta-amylase to said gel and separating and recovering the gel.

CONSTITUTION Wheat starch waste liquid is added with about 1-10mM, preferably 3-8mM of a phosphate ion-donative compound and with about 5-50mM, preferably 15-40mM of a calcium ion-donative compound and the components are made to react with each other at 5-50 deg.C, preferably 15-35 deg.C and pH6-9, preferably 6.5-7.5 for about 1-10hr to obtain calcium phosphate gel containing adsorbed and captured beta-amylase. The gel is separated and recovered to obtain the objective beta-amylase agent concentrated to about 1/20-1/50 of the original waste liquid in terms of volume. Furthermore, acids or water-soluble salts are added to the suspension of said gel and the solubilized beta-amylase is separated and recovered from the gel to obtain a beta-amylase agent.

Tiedot otettu esp@cenet:n tietokannasta - 12

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-248389

⑬ Int. Cl.⁴

C 12 N 9/26

識別記号

庁内整理番号

A-8828-4B

⑭ 公開 昭和63年(1988)10月14日

審査請求 有 発明の数 2 (全6頁)

⑮ 発明の名称 小麦β-アミラーゼ剤の製造方法

⑯ 特 願 昭62-82725

⑰ 出 願 昭62(1987)4月2日

⑱ 発 明 者	松 村	芳 一	奈良県生駒郡斑鳩町興留6丁目8番17号
⑱ 発 明 者	岡 崎	弘 三 郎	京都府宇治市木幡南端57番地の2
⑱ 発 明 者	岡 島	昭 博	大阪府枚方市招提南町3丁目17番2-407号
⑱ 発 明 者	堰 口	義 明	大阪府和泉市王子町782番地の3
⑱ 発 明 者	前 田	主 税	大阪府大阪市住吉区长居町西1丁目12番36号
⑱ 発 明 者	宮 嶋	俊 吉	大阪府寝屋川市池田1丁目10番1号
⑲ 出 願 人	上田化学工業株式会社		大阪府寝屋川市高柳1丁目2番6号
⑳ 代 理 人	弁理士 三枝 英二		外2名

明 細 書

発明の名称 小麦β-アミラーゼ剤の製造方法

特許請求の範囲

- ① β-アミラーゼを含む小麦澱粉製造廃液中でリン酸カルシウムゲルを形成させて、該ゲルにβ-アミラーゼを吸着させ、β-アミラーゼを吸着した上記ゲルを分離、回収することを特徴とする小麦β-アミラーゼ剤の製造方法。
- ② β-アミラーゼを含む小麦澱粉製造廃液中でリン酸カルシウムゲルを形成させて、該ゲルにβ-アミラーゼを吸着させ、β-アミラーゼを吸着した上記ゲルを分離後、これに酸又は水溶性塩類を添加してゲルからβ-アミラーゼを可溶化して分離、回収することを特徴とする小麦β-アミラーゼ剤の製造方法。

発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、小麦β-アミラーゼ剤の製造方法、

より詳しくは、小麦澱粉製造廃液からβ-アミラーゼを回収する方法に関する。

従来技術とその問題点

小麦澱粉製造廃液は、小麦粉に等量の水を加えてドウ(dough)を形成させ、次いでこれを水洗してグルテンと澱粉乳とに分離し、該澱粉乳から澱粉を遠心分離して得られる上澄液である。この廃液は、通常原料小麦粉の約10倍重量発生し、原料小麦粉中のβ-アミラーゼの大部分を含有している。しかして、上記β-アミラーゼの力価は廃液1ml当たり通常約50~130単位である。

なお、このβ-アミラーゼの1単位とは、可溶性澱粉を基質として、40℃で1分間に1μモルのマルトースを生成する酵素量である。上記β-アミラーゼの力価は、1.12%可溶性澱粉溶液9ml[1/20M酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.5)を含む]に、供試β-アミラーゼ溶液1mlを加え、40℃で10分間作用させて、

生じた還元糖（マルトース）をフェーリング・レーマン・ショール法にて測定することにより、算出される。以下、本明細書を通じて、 β -アミラーゼ力価の測定法及びその単位は上記と同様とする。

上記小麦澱粉製造廃液中に含まれる β -アミラーゼを回収する方法としては、従来より種々研究開発されている（例えば特公昭57-48954号公報、特公昭57-52836号公報、特公昭60-18393号公報等参照）。しかしながら、之等の方法はいずれも工業的実施に際して、工業設備等の面、効率の面、経済性の面、得られる酵素製剤自体の面等でなお改善されるべき問題点があり、満足できるものではない。

本発明者らは、上記現状に鑑み従来の方法に比しより効率よくしかも経済的に、小麦澱粉製造廃液から β -アミラーゼ剤を得る方法を開発することを目的として鋭意研究を重ねた。その結果、小

ができる。

本発明方法においては、小麦澱粉製造廃液中でリン酸カルシウムゲルを形成させることを必須の要件とする。しかしてこのゲルの形成は、リン酸イオン（ H_2PO_4^- 、 HPO_4^{2-} 、 PO_4^{3-} ）とカルシウムイオン（ Ca^{+2} ）との結合により行なわれるものであり、従って本発明方法は、小麦澱粉製造廃液中に、上記リン酸イオンを提供する化合物とカルシウムイオンを提供する化合物とを添加存在させることにより実施される。ここで上記リン酸イオンを提供する化合物としては、リン酸の他、各種の水溶性リン酸塩類、例えばリン酸のナトリウム塩、カリウム塩、アンモニウム塩等を単独で又は適宜組合せて使用できる。またカルシウムイオンを提供する化合物としては、例えば水酸化カルシウム、酸化したカルシウム（これは廃液中で水酸化カルシウムとなる）等や水溶性カルシウム塩類、例えば塩化カルシウム、硝酸カルシウ

小麦澱粉製造廃液中でリン酸カルシウムゲルを形成させるときには、該ゲル中に所望の β -アミラーゼが選択的に効率よく吸着捕集されると云う事実を見出した。本発明は、かかる知見を基礎として完成されたものである。

問題点を解決するための手段

本発明は、 β -アミラーゼを含む小麦澱粉製造廃液中でリン酸カルシウムゲルを形成させて、該ゲルに β -アミラーゼを吸着させ、 β -アミラーゼを吸着した上記ゲルを分離、回収することの特徴とする小麦 β -アミラーゼ剤の製造方法並びに上記ゲルを分離後、これに酸又は水溶性塩類を添加してゲルから β -アミラーゼを可溶化して分離、回収することの特徴とする小麦 β -アミラーゼ剤の製造方法に係わる。

本発明方法によれば、上記の通り、非常に簡単な操作で、効率よく、しかも経済的に有利に、高品質、高力価の β -アミラーゼ剤を製造すること

ム等の無機カルシウム塩類及び酢酸カルシウム、乳酸カルシウム等の有機カルシウム塩類を例示できる。之等の化合物もまたその1種を単独で用いることもでき、2種以上を併用することもできる。上記リン酸イオンを提供する化合物の廃液に対する添加量は、一般に約1～10mM程度、好ましくは約3～8mM程度の濃度となる量とするのが適当である。またカルシウムイオンを提供する化合物の添加量は、通常約5～50mM程度、好ましくは約15～40mM程度の濃度となる量とするのが一般的である。

上記リン酸イオンとカルシウムイオンとの反応によるゲル形成時の温度条件は、特に制限されるものではなく、反応促進の面からは高い方が好ましいが、 β -アミラーゼの安定性の面を加味すると通常約5～50℃程度、より好ましくは約15～35℃程度の範囲から選択されるのがよい。また上記ゲル形成時の液のpH条件は、通常約

6.0~9.0の範囲、好ましくは約6.5~7.5の範囲とするのがよく、このpH条件の選択のために、必要に応じて適当な酸や塩基を原料廃液中に添加することも可能である。所望ゲルの形成は、液を適宜脱拌することにより、通常約1~10時間程度を要して行なわれ、かくして廃液中のβ-アミラーゼの殆んどすべてを吸着捕集したリン酸カルシウムゲルが生成する。

かくして、得られるリン酸カルシウムゲルの懸濁液は、そのままで水不溶性(固定化)酵素剤として利用できるが、通常は該懸濁液を静置してゲルを沈降させ、原料とする小麦澱粉製造廃液の約1/5~1/20の容積となって沈降するゲルの沈澱と上澄液とを、例えばデカンテーション、遠心分離等により分離し、該沈澱を回収するのがよい。この分離操作の採用によれば、通常、元の小麦澱粉製造廃液の約1/20~1/50の容積に濃縮された本発明のβ-アミラーゼ剤が取得さ

取得できることが見出された。

この本発明の第2の方法においては、上記本発明の第1の方法で分離、回収されたリン酸カルシウムゲルの懸濁液、より好ましくは元の小麦澱粉製造廃液の約1/5~1/20の容積にまで濃縮されたゲルの懸濁液に、酸又は水溶性塩類を添加することにより実施される。ここで酸としては、無機、有機を問わず上記懸濁液のpHを酸性側、通常約3.5~5.5、より好ましくは約4.0~5.0に調整できるものであればいずれでも利用できる。代表的上記酸としては、例えば塩酸、硫酸、リン酸、ホウ酸等の無機酸及び酢酸、乳酸、クエン酸、酒石酸等の有機カルボン酸、有機スルホン酸、有機ホスホン酸等を例示できる。之等の酸を上記ゲル懸濁液中に添加するときには、ゲルが溶解し、このゲルに吸着捕集されていたβ-アミラーゼが可溶化されて、所望のβ-アミラーゼ溶液が得られる。

れる。また上記沈澱の回収は、勿論他の通常行なわれている各種の操作、例えば濾過等によっても行なうことができる。更に、上記で回収される水不溶性酵素剤は、これに通常の送風乾燥操作や真空乾燥操作等を施すことにより、粉末形態の水不溶性(固定化)β-アミラーゼ剤とすることもできる。

本発明は、また上記リン酸カルシウムゲルに吸着捕集された形態の水不溶性β-アミラーゼ剤の製造方法と共に、該ゲルより可溶化されて分離、精製されたβ-アミラーゼ剤の製造方法をも提供するものである。

本発明者らの研究によれば、上記β-アミラーゼを吸着捕集したリン酸カルシウムゲルは、これに適当な酸又は水溶性塩類を作用させることにより、その吸着捕集しているβ-アミラーゼを容易に収率よく溶出させ得、この溶出操作によって、精製された高品質・高力価のβ-アミラーゼ剤を

また、上記水溶性塩類は、カルシウムイオンとの結合力の強いものから選択される。その例としては、例えば硫酸、リン酸、ポリリン酸等の無機酸のナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、アンモニウム塩等；クエン酸、酒石酸等の有機カルボン酸、有機スルホン酸、有機ホスホン酸等のアルカリ金属塩、アンモニウム塩等；エチレンジアミン四酢酸、ニトリロ三酢酸等のアルカリ金属塩、アンモニウム塩等のキレート作用を有する塩類等を挙げることができる。之等の水溶性塩類は、リン酸カルシウムゲル中のカルシウムイオンと結合して、ゲルを分解し、かくしてゲルに吸着捕集されているβ-アミラーゼを可溶化することができる。上記水溶性塩類は、通常その少なくとも1種をリン酸カルシウムゲルの懸濁液中に約0.005~1.5M、好ましくは約0.02~1.0Mの濃度となるように添加され

るのがよい。之等塩類の添加による β -アミラーゼの可溶化反応は、一般にpH約5.5~9.0の範囲で、室温又はその付近の温度下に約5~30分間程度を要して行なわれる。上記可溶化反応の際には、必要に応じて適当なpH調整剤を添加利用することもでき、また反応促進のために攪拌等の操作を採用することもできる。

更に、本発明の上記第2の方法における可溶化反応は、勿論前記酸と水溶性塩類とを併用して実施することもできる。

上記可溶化反応により得られる β -アミラーゼ溶液は、遠心分離、濾過等の通常的手段により、未溶解のリン酸カルシウムゲル、その他の不溶物を除去され、清澄な β -アミラーゼ剤液とされる。

上記で得られる β -アミラーゼ剤液は、常法に従い硫酸アンモニウムや硫酸ナトリウムを用いた塩析及びこれに引続く乾燥操作により、或いは限外濾過等による濃縮後に、同様の塩析及び乾燥操

作を行なうことにより、高品質、高力価の精製 β -アミラーゼ粉末製剤とすることができる。更に、粉末形態の酵素剤は、上記濃縮液に噴霧乾燥等の手段を施すことによっても取得できる。また本発明の β -アミラーゼ剤は、上記濃縮液に、慣用される安定化剤等を添加して得られる液状形態であってもよい。

かくして、本発明によれば、小麦澱粉製造廃液から、非常に簡単な操作で、効率よく、しかも経済的に有利に、高力価・高品質の β -アミラーゼ剤を製造することができる。

実 施 例

以下、本発明を更に詳細に説明するため、実施例を挙げる。

実施例1

25℃に保持された小麦澱粉製造廃液30ℓ (β -アミラーゼ力価：85.6単位/mℓ)に、1/2Mのリン酸二ナトリウム(Na_2HPO_4)

実施例2

実施例1において得られた、 β -アミラーゼを吸着捕集したリン酸カルシウムゲルの沈澱100gを、真空乾燥して粉末形態の本発明 β -アミラーゼ剤8.9gを得た。

この粉末の β -アミラーゼ力価は、1g当り20500単位であり、用いた小麦澱粉製造廃液からの収率は68.2%であった。

実施例3

実施例1において得られた、 β -アミラーゼを吸着捕集したリン酸カルシウムゲルの沈澱100gに水125mℓを加えて懸濁液とし、これに希釈したリン酸を加えてpHを4.5に調整し、30分間攪拌した後、遠心分離(3000rpm、10分間)して、清澄な液181mℓを得た。

この清澄液の β -アミラーゼ力価は、1170単位/mℓであり、用いた小麦澱粉製造廃液からの収率は79.2%であった。

溶液300mℓ、次いで1Mの塩化カルシウム($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)溶液600mℓを順次加え、更に希釈したアンモニア水を添加してpHを6.5~7.0に調整しながら、2時間ゆるく攪拌して、リン酸カルシウムゲルを形成させた。

得られた懸濁液を小型の遠心分離機(5000rpm)にかけ、上澄液30.6ℓと、 β -アミラーゼを吸着捕集したリン酸カルシウムゲルを主成分とする沈澱960gとを分離し、かくして水不溶性の本発明 β -アミラーゼ剤を得た。

上記上澄液の β -アミラーゼ力価は1.2単位/mℓであり、これは用いた廃液中に含まれていた β -アミラーゼの約1.4%量に相当した。

また、上記沈澱10gを水に懸濁させて100mℓとし、その β -アミラーゼ力価を測定したところ、懸濁液1mℓ当り235単位であり、沈澱1g当りに換算すると2350単位となり、用いた廃液からの収率は87.9%であった。

第 1 表

例No.	水 溶 性 塩 類	収率 (%)
4	硫酸ナトリウム	78.3
5	硫酸カリウム	76.9
6	硫酸アンモニウム	77.6
7	硫酸マグネシウム	65.7
8	硫酸アルミニウム	64.6
9	リン酸二ナトリウム	77.9
10	リン酸二カリウム	78.0
11	リン酸二アンモニウム	78.2
12	三リン酸ナトリウム	76.3
13	三メタリン酸ナトリウム	75.8
14	クエン酸ナトリウム	79.9
15	酒石酸ナトリウム	77.5
16	エチレンジアミン四酢酸 ・二ナトリウム	78.1
17	ニトリロ三酢酸二ナトリ ウム	77.4

実施例4~17

実施例1において得られた、 β -アミラーゼを吸着捕集したリン酸カルシウムゲルの沈澱500gに、水600mlを加えて懸濁液とし、この懸濁液を50mlずつ分注し、これらに下記第1表に記載の種々の水溶性塩類をそれぞれ終末0.3Mの濃度となるように添加すると共に、pH調整剤として塩酸又は水酸化ナトリウムを用いて各液のpHを6.5に調整し、室温で30分間攪拌した。その後、遠心分離(3000rpm、10分間)して、上澄液として本発明の β -アミラーゼ剤を得た。

得られた各上澄液の β -アミラーゼ活性を測定し、用いた小麦澱粉製造廃液からの収率を算出した結果を下記第1表に併記する。

実施例18

30℃に保持された小麦澱粉製造廃液100ℓ(β -アミラーゼ力価:81.9単位/ml)に、0.3Mのリン酸(H_3PO_4)溶液1.3ℓ及び2Mの塩化カルシウム溶液0.5ℓを加え、次いで1Mに相当する水酸化カルシウム

[$Ca(OH)_2$]の懸濁液1ℓを加え(pHは6.5付近となる)、更に希釈したアンモニア水を加えてpHを6.5~7.0に調整しながら、約2時間ゆるく攪拌した。その後、約1時間静置して形成されたリン酸カルシウムゲルを沈降させ、上澄液85ℓをデカンテーションにより分離除去し、沈澱区分を小型連続遠心分離機(5000rpm)にかけて、2.8kgの沈澱を得た。

上記デカンテーション及び遠心分離により得られた上澄液(102ℓ)中の β -アミラーゼ力価は3.3単位/mlであり、これは用いた小麦澱粉製造廃液中に含まれていた β -アミラーゼの

4.1%量に相当した。

得られた β -アミラーゼを吸着捕集したリン酸カルシウムゲルの沈澱2.8kgに、2ℓの水を加えて懸濁液を調製し、これに硫酸アンモニウム250gを添加して沈澱を溶解させ、30分間攪拌した後、濾過し、4.2ℓの濾液を得た。

このものの β -アミラーゼ力価は、1400単位/mlであり、用いた廃液からの収率は71.8%であった。

更に、上記濾液を小型の限外濾過機(分画分子量:15000)を用いて1ℓに濃縮した後、硫酸アンモニウム300gを添加、溶解させて β -アミラーゼを塩析させ、次いで少量のケイソウ土を加えて濾過し、沈澱を集めて真空乾燥して、精製 β -アミラーゼ粉末56gを得た。

この粉末の β -アミラーゼ力価は、93300単位/gであり、原料廃液からの収率は63.8%であった。

手 続 補 正 書 (自 発)

昭和62年5月11日

特許庁長官 黒 田 明 雄 殿

補 正 の 内 容

- 1 事件の表示
昭和62年特許願第82725号
- 2 発明の名称
小麦β-アミラーゼ剤の製造方法
- 3 補正をする者
事件との関係 特許出願人
上田化学工業株式会社
- 4 代 理 人
大阪市東区平野町2の10 沢の鶴ビル
(6521) 弁理士 三 枝 英 二
- 5 補正命令の日付
自 発
- 6 補正の対象
明細書中「発明の詳細な説明」の項
- 7 補正の内容
別紙添付の通り

- 1 明細書第4頁第3行、第7頁第7行、第8頁第9行、同頁第14行、同頁第16行、第9頁第16行、第10頁第14行、第13頁第8行第15頁第3行及び第18頁第2行に「捕集」とあるをそれぞれ「捕集」と訂正する。

(以上)

